

ラット単離海馬CA1錐体細胞にみられる低閾値(T型) Ca²⁺電流に対するCa²⁺拮抗薬の効果

著者	高橋 和義
号	2276
発行年	1991
URL	http://hdl.handle.net/10097/20535

氏 名（本籍）	たか 高	はし 橋	かず 和	よし 義
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	医	第	2 2 7 6	号
学位授与年月日	平	成	3 年	2 月 27 日
学位授与の条件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
最 終 学 歴	昭 和 58 年 3 月 富山医科薬科大学大学院薬学研究科 博士前期課程修了			

学 位 論 文 題 目	Calcium Antagonist Effects on Low-threshold (T-type) Calcium Current in Rat Isolated Hip- pocampal CA1 Pyramidal Neurons. （ラット単離海馬CA1錐体細胞にみられる低閾値 (T型) Ca^{2+} 電流に対する Ca^{2+} 拮抗薬の効果）
-------------	---

	(主 査)			
論 文 審 査 委 員	教授	赤 池 紀 生	教授	平 則 夫
	教授	渡 辺 建 彦		

論文内容要旨

【目 的】

脳虚血に伴う脳神経細胞壊死には細胞内 Ca^{2+} 濃度の異常な増加が関与しており、その細胞内 Ca^{2+} 増加にはグルタメイトレプターの異常興奮と電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} 流入とが関係している。実際、 Ca^{2+} チャネル拮抗薬であるニカルジピンやフルナリジンは動物を用いた完全脳虚血によって生じる脳神経障害を改善する。しかし、この脳神経障害改善には必ずしも脳血流の改善を伴っていない、脳神経細胞の Ca^{2+} チャネルに直接作用する可能性が考えられる。ところで、神経には3タイプの Ca^{2+} チャネル（T, N, L型）がある。T型はニューロンの自発ならびにバースト放電やリバウンド興奮に重要な役割を担っており、LとN型は興奮収縮、興奮分泌に関するチャネルと考えられている。興味あることは、抗てんかん薬であるフェニトインが脳虚血実験で脳神経細胞壊死を保護するという報告があること、また、培養海馬細胞や単離した海馬神経細胞を用いた実験でもフェニトインがL型 Ca^{2+} チャネルにそれほど影響を与えない濃度で強くT型 Ca^{2+} チャネルを抑制すること、更に、フルナリジンも抗てんかん作用を有することが明らかとなっている。以上の実験事実は、T型 Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} の細胞内への流入が細胞壊死と強く関連する可能性が示唆され、 Ca^{2+} を介した細胞壊死を考える上で、 Ca^{2+} 拮抗薬のT型 Ca^{2+} チャネルへの作用を検討することは重要と考えられる。そこで我々は近年確立したホ乳動物脳神経細胞を形態と生理機能をよく維持しながら単離する方法と既に確立していた外液瞬時交換法を用いて虚血性の神経細胞壊死を生じ易い海馬CA 1部位の錐体細胞におけるT型 Ca^{2+} チャネルに対する Ca^{2+} 拮抗薬の作用を詳細に研究したので報告する。

【方 法】

7-14日齢のラット脳から海馬を取り出し約500 μ の厚さの脳薄切片標本とした後、pronase 0.25%, thermolysin 0.25%を含む31℃の溶液でそれぞれ20分間ずつ処理した。その後脳薄切片より海馬のCA 1領域にあたる所をパンチングにより摘出し、ピペッティングにより機械的に錐体細胞を単離した。単離した細胞は吸引電極法で細胞内灌流し、 Ca^{2+} 電流を他のイオン電流より分離した。細胞への薬物等を含む外液の投与にはその細胞外液を数msec以内に急速交換できる外液瞬時交換法を使用した。用いた外液および内液の組成は、外液 (in mM) : choline-Cl 140, CsCl 5, CaCl_2 10, glucose 10, HEPES 10。内液 (in mM) : N-methyl-D-glucamine fluoride 100, TEA-Cl 20, HEPES 10。外液および内液のpHはそれぞれTris-baseで7.4と7.2に調整した。実験は全て室温（20-22℃）で行った。

【結 果】

海馬CA1領域より単離した錐体細胞には膜電位固定下に4種類の Ca^{2+} 感受性で、しかも膜電位依存性の Ca^{2+} 電流が存在した（テトロドトキシン感受性、T、N、L型 Ca^{2+} 電流）。これら4種類の Ca^{2+} 電流からのT型 Ca^{2+} 電流の分離は外液に 10^{-7}M テトロドトキシンを添加し、細胞内液に F^{-} を灌流させることにより行った。分離後のT型 Ca^{2+} 電流は -100mV の保持電位より -60mV 以上の脱分極パルスに膜に与えたときに出現し、その電流・電圧曲線での最大内向き電流の発生膜電位は -30mV 付近であった。その活性化および不活性化過程はともに高い膜電位依存性を示し、不活性化相は一つの指数関数成分であった。外液 Ca^{2+} 濃度 10mM 、保持電位 -100mV の条件下で、種々の有機および無機の Ca^{2+} 拮抗薬はT型 Ca^{2+} 電流を濃度依存的に以下の様に抑制した。その抑制活性を ID_{50} 値（T型 Ca^{2+} 電流を50%抑制する濃度）で示すと、有機 Ca^{2+} 拮抗薬で、フルナリジンは $1.2 \times 10^{-6}\text{M}$ 、ニカルジピンは $1.6 \times 10^{-6}\text{M}$ 、D600は $1.2 \times 10^{-4}\text{M}$ 、ジルチアゼムは $2.1 \times 10^{-4}\text{M}$ であり、無機 Ca^{2+} 拮抗薬で、 La^{3+} は 10^{-6}M 、 Zn^{2+} は $2 \times 10^{-6}\text{M}$ 、 Cd^{2+} は $8 \times 10^{-5}\text{M}$ 、 Ni^{2+} は $2.3 \times 10^{-4}\text{M}$ 、 Co^{2+} は $7.6 \times 10^{-4}\text{M}$ であった。これら有機 Ca^{2+} 拮抗薬のT型 Ca^{2+} 電流の抑制は使用頻度依存的であり、その強さの順はニカルジピン＝フルナリジン>D600>ジルチアゼムであった。更に、これらの拮抗薬はT型 Ca^{2+} チャネルの不活性化からの回復過程を著明に延長させ、その作用はフルナリジンが最も強く、次いでニカルジピン、D600であり、ジルチアゼムが最も弱かった。膜電位依存性はD600、ニカルジピンが強く、フルナリジンおよびジルチアゼムが弱かった。以上のT型 Ca^{2+} チャネルに対するフルナリジンの性質を考慮し、生理的条件下に近い外液 Ca^{2+} 濃度 2.5mM 、刺激頻度 1Hz 、保持電位 -100mV の条件下でその抑制活性（ ID_{50} ）を求めると $3.2 \times 10^{-8}\text{M}$ であった。以上、ラット海馬神経には、その電流キネティクスと有機 Ca^{2+} 拮抗薬に対する高い感受性によって特徴づけられるT型 Ca^{2+} チャネルが存在することがわかった。そして、その薬理的性質は心筋、平滑筋、末梢神経および培養神経のそれとは異なっていた。

審 査 結 果 の 要 旨

T型Caチャンネルは静止膜電位近くの低閾値で活性化され、スパイク発火のトリガーやバースト状発火を形成して細胞の興奮に関与する。それ故に、脳虚血に対して強い虚弱性を、また痙攣発生源の一つと考えられている海馬で、このT型Caチャンネルが存在する可能性は大と考えられた。申請者はその主論文ならびに副論文において、ラット海馬CA1領域の錐体細胞を酵素ならびに機械的処理によって分離した後、吸引電極法を用いwhole-cell様式でT型Ca電流を記録し、そのキネティクスとそれに対するCa拮抗剤の作用機序を検討している。

キネティクス解析ではT型Ca電流の活性・不活性化速度、電流・電圧曲線、不活性化曲線、不活性からの回復曲線とその電位依存性、2価陽イオンに対する透過性や温度依存性を明らかにし、T型Caチャンネルの電気的膜特性を解明した。引続き、このT型Caチャンネルへの電流・電圧曲線、回復曲線、不活性化曲線への各種Ca拮抗剤の影響を研究することにより、薬剤による抑制の作用機序ならびに抑制の効果比が中枢と末梢組織標本とは大きく異なることを明らかにした。加えて、提出資料にみた研究へのアプローチ、得られた実験成績も十分に充実しており、博士論文として十分に評価されうるものである。